

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 3月20日
Date of Application:

出願番号 特願2003-078898
Application Number:

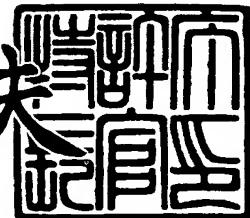
[ST. 10/C] : [JP 2003-078898]

出願人 シスメックス株式会社
Applicant(s):

2004年 3月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP02-1126
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/569
【発明者】
【住所又は居所】 熊本県熊本市本荘1丁目1番1号 熊本大学医学部付属病院内
【氏名】 山口 一成
【発明者】
【住所又は居所】 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1 宮崎大学農学部付属家畜病院内
【氏名】 堀井 洋一郎
【発明者】
【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスマックス株式会社内
【氏名】 高浜 洋一
【発明者】
【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスマックス株式会社内
【氏名】 永井 慎也
【特許出願人】
【識別番号】 390014960
【氏名又は名称】 シスマックス株式会社
【代理人】
【識別番号】 100088904
【弁理士】
【氏名又は名称】 庄司 隆
【電話番号】 03-3864-6572

【選任した代理人】

【識別番号】 100124453

【弁理士】

【氏名又は名称】 資延 由利子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200385

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ボルナ病ウイルス検出抗原及び試薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下に示すいずれかの抗原ポリペプチド；

1) ボルナ病ウイルス (B D V) 蛋白質の p 10 領域から選択された抗原ポリペプチドであって、該ポリペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B D V抗体検出能を有することを特徴とする抗原ポリペプチド。

2) 上記1) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、少なくとも8個のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

3) 上記2) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、8～20のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

4) 配列番号5、6、7又は8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

5) 上記1)～4) のいずれか1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B D V抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載の抗原ポリペプチドに、1若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の抗原ポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲートB D V抗原。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1に記載の抗原ポリペプチド又はコンジュゲートB D V抗原を使用する抗B D V抗体の検出方法。

【請求項5】 請求項1～3のいずれか1に記載の抗原ポリペプチド及び／又はコンジュゲートB D V抗原と、以下に示すいずれかのポリペプチド及び／又はコンジュゲートB D V抗原を少なくとも1つ選択して組み合わせて使用する抗B D V抗体の検出方法；

1) 配列番号1～6のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチド。

2) 上記1)に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B DV抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

3) 上記1)及び／又は2)に記載の抗原ポリペプチドに、1若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド。

4) 上記1)～3)のいずれか1に記載のポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲートB DV抗原。

【請求項6】 抗B DV抗体の検出方法が免疫凝集反応による請求項4又は5に記載の抗体検出方法。

【請求項7】 免疫凝集反応が微粒子計数免疫測定法である請求項6に記載の抗体検出方法。

【請求項8】 請求項1～3のいずれか1に記載のポリペプチド又は抗原を含む抗B DV抗体検出用試薬。

【請求項9】 請求項1～3のいずれか1に記載のポリペプチド又は抗原が不溶性担体に感作されてなる請求項8に記載の試薬。

【請求項10】 請求項8又は9に記載する抗B DV抗体検出用試薬を1若しくは複数個含む抗B DV抗体検出用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗B DV抗体測定用ポリペプチド及び抗B DV抗体測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ボルナ病ウイルス(Borna Disease Virus, 以下「B DV」という。)を原因ウイルスとする免疫関与神経症候群であるボルナ病についてはいまだ解明されていないことが多い。ボルナ病は、ドイツ及びその周辺諸国で、四季を通じて馬に発生するウイルス性脳脊髄縁である。脳性麻痺や情動傷害等の症状を呈し、急性経過

をたどると致死的である。脳性麻痺や情動傷害等の症状を呈し、急性経過をたどると致死的である。ラットに実験的に感染させると、多動、常同行動、運動障害及び失調症を特徴とする多相性症候群を発症する(O. Narayanら, Science, 220: 1401-1403(1983))。

【0003】

BDVは、自然宿主であるウマに対する病原性が知られており、1985年に精神疾患患者の血清中にBDVと反応する抗体が存在することが指摘され、ヒトに対しても病原性をもつ可能性が示唆されてきた。BDVの感染疫学的研究は、精神疾患の理解に多大な貢献をすることになる。最近、BDV遺伝子が精神疾患遺伝子群の血球に高い頻度で認められ、また献血患者の5%程度においても遺伝子が血球に検出されるという報告がなされている。

【0004】

BDVは低い力価でしか増殖しないので、分析のために精製することは困難である。BDV感染の診断は、この疾患に共通する臨床症状の出現、及び間接免疫蛍光検査（IFT）（G. Pauliら、Zbl. Vet. Med. [B] , 31:552-557 (1984)）、ウエスタンプロット又は免疫沈澱等により、感染細胞中のウイルス蛋白質を検出する血清抗体を検出することにより行っている。これらの方法は取り扱いが難しく、ヒトや家畜集団の大量調査で用いるのは困難である。

BDVの配列は既に解明され、抗BDV抗体をイライザ法(ELISA)で測定する方法が報告されており、ここではp23、recp23、p40及びrecp40抗原を使用している（特許文献1）。また、血漿中のBDV特異的な循環免疫複合体（CIC）を決定する事を含む試験方法も報告されており、ここではp40及びp24抗原が使用されている（特許文献2）。さらに、p40及びp24の領域から選択される具体的なアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチドを用いた磁気ビーズによる抗体検出方法も報告されている（特許文献3）。

【0005】

しかしながら、BDVの性質については、未だ十分に解明されているとはいえない、BDVに対する抗体の出現の時期や正確な抗体の検出方法については不明な点が多く残されており、より正確な抗体検出方法の開発が望まれている。

【0006】**【特許文献1】**

特開2002-190288号公報

【特許文献2】

特表2002-500363号公報

【特許文献3】

特開平11-180998号公報

【0007】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、B D Vに対する抗体検査をより正確に実施するための抗原ポリペプチド及び該ポリペプチドを用いた抗B D V抗体測定方法を提供することにある。

【0008】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、B D Vを構成する蛋白質のうち、p 1 0 領域から選択された抗原を単独あるいはp 2 4 領域及び／又はp 4 0 領域から選択される抗原ポリペプチドと組み合わせて使用することにより、上記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明は、

1. 以下に示すいずれかの抗原ポリペプチド；
 - 1) ボルナ病ウイルス（B D V）蛋白質のp 1 0 領域から選択された抗原ポリペプチドであって、該ポリペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B D V抗体検出能を有することを特徴とする抗原ポリペプチド。
 - 2) 上記1) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、少なくとも8個のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。
 - 3) 上記2) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、8～20のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

4) 配列番号 5、6、7又は8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

5) 上記1)～4)のいずれか1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B DV抗体検出能を有する抗原ポリペプチド、

2. 前項1に記載の抗原ポリペプチドに、1若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド、

3. 前項1又は2に記載の抗原ポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲートB DV抗原、

4. 前項1～3のいずれか1に記載の抗原ポリペプチド又はコンジュゲートB DV抗原を使用する抗B DV抗体の検出方法、

5. 前項1～3のいずれか1に記載の抗原ポリペプチド及び／又はコンジュゲートB DV抗原と、以下に示すいずれかのポリペプチド及び／又はコンジュゲートB DV抗原を少なくとも1つ選択して組み合わせて使用する抗B DV抗体の検出方法；

1) 配列番号1～6のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチド。

2) 上記1)に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B DV抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

3) 上記1)及び／又は2)に記載の抗原ポリペプチドに、1若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド。

4) 上記1)～3)のいずれか1に記載のポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲートB DV抗原、

6. 抗B DV抗体の検出方法が免疫凝集反応による前項4又は5に記載の抗体検出方法、

7. 免疫凝集反応が微粒子計数免疫測定法である前項6に記載の抗体検出方法、

8. 前項1～3のいずれか1に記載のポリペプチド又は抗原を含む抗B DV抗体

検出用試薬、

9. 前項1～3のいずれか1に記載のポリペプチド又は抗原が不溶性担体に感作されてなる前項8に記載の試薬、

10. 前項8又は9に記載する抗B DV抗体検出用試薬を1若しくは複数個含む抗B DV抗体検出用試薬キット、からなる。

【0010】

【発明の実施の形態】

(抗原ポリペプチド)

B DVの感染の診断を行うために、本発明の抗原ポリペプチド、すなわち以下に示すいずれかの抗原ポリペプチドを用いることができる。具体的には、次の1)～4)のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを使用することができる。

1) B DV蛋白質のp 10領域から選択された抗原ポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B DV抗体検出能を有することを特徴とする抗原ポリペプチド。

2) 上記1)に記載の選択された抗原ポリペプチドが、少なくとも8個のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

2) 上記1)に記載の選択された抗原ポリペプチドが、8～20のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

3) 配列番号5、6、7又は8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

4) 上記1)～3)のいずれか1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B DV抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

【0011】

上記の抗原ポリペプチドは、1若しくは複数種選択することができる。また、他の公知の抗原及び／又は抗原ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。例えば、B DV蛋白質のp 24領域及び／又はp 40領域から選択される抗原ポリペプチドを組み合わせて使用することができる。具体的には、1)配列番号1～6のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチド、

2) 上記1)に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗B D V抗体検出能を有する抗原ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。また、一のポリペプチドに、少なくとも配列番号5、6、7、8に記載のアミノ酸配列を1又は2以上含有したポリペプチドを用いて、B D V抗体を検出しても良い。また、この配列番号5、6、7、8に示されるポリペプチドは、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであっても良い。

【0012】

本発明で使用する抗原ポリペプチドは、配列情報に基づいて、通常の手法で合成により調製することができる。また、抗原ポリペプチドを固相担体や、蛋白質等に効率良く結合させる目的で、1若しくは複数個のアミノ酸をスペーサとして抗原ポリペプチドのN末端側に付加することができる。スペーサとして機能しうるアミノ酸の例としては、グリシン、リジンが挙げられるが、好ましくはグリシンである。

【0013】

特に具体的に例示されるB D V抗原ポリペプチドの配列として、以下のものが挙げられる。各配列の最左部に示す1又は2のグリシンは、スペーサを表す。

| | | | |
|-----------------|------------|------------------------|---------|
| p 2 4 | P1: 41-55 | GG-QPVDQLLKDLRKNPS | (配列番号1) |
| | P2: 59-77 | GG-DPDQRTGREQLSNDELI | (配列番号2) |
| p 4 0 | P3: 3-20 | GG-PKRLVDDADAMEDQDLY | (配列番号3) |
| | P4:338-358 | GG-RYRRREISRGEDGAELSGE | (配列番号4) |
| p 1 0 (No/98) | | | |
| | P5: 18-36 | G-GNTTVESGRLSGGRRRSPD | (配列番号5) |
| | P6: 43-57 | G-GLTKTKEDSKECTDP | (配列番号6) |
| p 1 0 (Control) | | | |
| | P7: 18-36 | G-GNATIESGRLPGGRRRSPD | (配列番号7) |
| | P8: 43-57 | G-GVTKTTEDPKECTDP | (配列番号8) |

【0014】**(抗体測定用試料)**

本発明の抗体測定用試料は、生体内の抗体が測定することができれば良く、特に限定されないが、ヒトや動物の全血、血漿、血清、骨髓、バフィーコート、尿、体液、唾液、鼻汁、涙液、糞便由来物等が例示される。

【0015】**(抗体測定方法)**

本発明の抗体測定方法は、本発明の抗原ポリペプチドを用いて測定する方法であれば良く、特に限定されない。例えば酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、凝集法、ウエスタンプロット法、化学発光免疫測定法、など常用されている方法のいずれも適用することができる。特に好ましい測定方法として、免疫凝集法が挙げられる。

例えば、凝集法の一種であるカウンティングインムノアッセイ法(Counting Immunoassay法：以下「CIA法」という。)による測定は、Sysmex Journal Vol.20 No.1, 77-86(1997)に記載の方法により行うことができる。

【0016】

抗原ペプチド感作用担体の例として、有機高分子粉末、無機物質粉末、微生物、血球及び細胞膜片などが挙げられる。有機高分子粉末としては、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどが例示でき、好ましくはラテックス粒子が広く利用される。ラテックスとしては、例えばポリスチレン、ポリスチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリルニトリル-ブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレート等が挙げられる。

【0017】

使用するラテックス粒子の素材及び粒子径は、免疫グロブリンの抗原抗体反応によりラテックス粒子が凝集塊を形成しうるものであれば良く、特に限定されない。ラテックスの平均粒径は、測定対象物の検出濃度あるいは測定機器により0.05～1.0μm、好ましくは0.3～0.85μmのものが適宜選択される。無機物質粉末としては、シリカ、アルミナ、あるいは金、チタン、鉄、ニッケ

ル等の金属片などが例示される。

【0018】

抗原ペプチド感作用担体、具体的に抗原（抗体）結合ラテックス粒子と試料に含まれる抗体（抗原）が反応すると、抗体の量に応じてラテックス粒子が凝集する。カウンティングタイムノッセイでは凝集した粒子ひとつひとつの大きさの違いを弁別してカウントして測定を行う。例えば、凝集していない単独のラテックス粒子のカウント数をM(Monomer)、2個以上のラテックス粒子が凝集したもののカウント数をP(Polymer)、MとPの和をT(Total)としたとき、P/Tを凝集度として算出することができる。

【0019】

担体への抗原感作は、抗原を直接ラテックス粒子に感作させても良く、例えば血清アルブミン等のようなリガンドを目的抗原に結合させて、ラテックス粒子に感作させるなど効率の良い方法を選択することができる。抗原感作量は、担体1mgあたり100 μ gまでの範囲で必要に応じて自由に設定することができる。好ましくは、上記抗原ペプチド及び／又はコンジュゲートB DV抗原ペプチドと非特異反応抑制のためのブロッキング剤として使用する蛋白質とあわせて合計100 μ gまでの範囲で設定することができる。ブロッキング剤は、抗原を感作した後又は抗原と一緒に担体に固定することができる。

【0020】

CIA法をはじめとする凝集法によると、ラテックス粒子に固定した抗原に対し、検体試料中の抗体が反応することにより、ラテックス粒子とラテックス粒子が抗体により架橋され、凝集を形成することになる。この場合に、IgMクラスの抗体であっても、IgGクラスの抗体であっても、ラテックスと反応すれば架橋を形成しうるので、IgM及びIgGが混入している検体試料において、IgM及びIgGを同時に測定することが可能となる。さらに、本方法は目的とする抗体が抗原ペプチドを感作した不溶性担体と結合することにより検出され、目的抗体をさらに蛍光物質等を感作した抗原や抗体等との反応を必要としない。即ち、本方法によると、ヒト及びヒト以外の哺乳動物の試料についても試薬を変更することなく同様にB DV抗体を検出することができる。B DVは、ウマ等の

哺乳動物及びヒトにも感染しうる人畜共通感染症にかかわるものであるため、ここで例示したCIA法を採用することは有用である。

【0021】

測定方法は公知の方法に従い、用いられる不溶性担体の大きさもしくは濃度、反応時間を設定することにより、散乱光強度、吸光度又は透過光強度の増加もしくは減少を測定することにより行うことができ、これらの方法を2種以上併用してもよい。

【0022】

本発明は、上記抗原ポリペプチドを含む試薬及び試薬キットにも及ぶ。

【0023】

【実施例】

以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0024】

(実施例1) 抗BDV抗体の検出

本実施例は、宮崎県都井岬で管理されているウマ17頭について、BDVの感染の有無を調べた。測定は、1998年に採取した血清について行った。

【0025】

(ウマ血清の処理方法)

具体的にお示しください。

【0026】

(抗原ペプチド)

P1, P3, P4, P7及びP8の抗原ペプチドを用いた。

【0027】

(抗原ペプチドの感作)

- 1) 抗原ペプチドp24 (P1) : ペプチド300 μ gをウシ血清アルブミン (BSA) 120 μ gとコンジュゲートさせたもの、

- 2) 抗原ペプチド p 4 0 (P3) : ペプチド $300\mu g$ を B S A $120\mu g$ とコンジュゲートさせたもの、
- 3) 抗原ペプチド p 4 0 (P4) : ペプチド $300\mu g$ を B S A $120\mu g$ とコンジュゲートさせたもの、
- 4) 抗原ペプチド p 1 0 (P7) : ペプチド $300\mu g$ を B S A $120\mu g$ とコンジュゲートさせたもの、
- 5) 抗原ペプチド p 1 0 (P8) : ペプチド $300\mu g$ を B S A $120\mu g$ とコンジュゲートさせたもの、

上記1)～5)のB D V抗原コンジュゲート液 μL を、粒径 $0.8\mu m$ のラテックス粒子懸濁液（ $5mg$ のラテックス担体を含む） $1mL$ に加え、 $37^{\circ}C$ で1時間静置した。その後、ラテックス粒子を洗浄し、各抗原の感作ラテックス液を調製した。

【0028】

(測定)

シスメックス社製測定装置（P A M I A - 5 0）を用いて抗B D V抗体を測定した。

反応プレートのウェルに、ラテックス凝集反応用緩衝液を $80\mu l$ 、各ウマ血清試料を $10\mu l$ 及び上記調製したラテックス粒子を含む溶液を $10\mu l$ を添加し、 $45^{\circ}C$ で反応させた。

反応を開始して約15分後に $19\mu l$ の反応混合物を装置のチャンバ内の $950\mu l$ のシース液に加えて51倍に稀釀した。稀釀により、凝集反応を停止させ、その後、凝集度を光学検出部で検出した。

予め測定しておいた検量線（陰性コントロールP/T%及びカットオフコントロールP/T%）より式1に従い、検体のカットオフインデックス（C O I）値を求めた。検体のC O I値により、以下のとおり判定した。

陽性：C O I ≥ 1

陰性：C O I < 1

【0029】

【式1】

$$\text{カットオフインデックス (COI)} = \frac{\text{(検体測定値P/T\% - 陰性コントロールP/T\%)}}{\left(\frac{\text{カットオフコントロール P/T\%}}{\text{陰性コントロール P/T\%}} \right)}$$

【0030】

(測定結果)

上記の測定結果を表1に示した。その結果、全てのウマ血清についてB DV要請を示した。

【0031】

(比較例1)

実施例1に記載のウマ17頭について、従来法により1998年～2001年にかけて採取した血清について測定を行った。ウマ血清の処理方法は実施例1と同様に行った。

【0032】

(E CL IAの測定方法についてお示しください。特に本発明は抗原ペプチドに関するものですので、E CL IA法で使用した抗原の情報をお知らせいただきたく、お願い致します。)

【0033】

(結果)

その結果、検体No. 1～9については、1998年の結果を比較すると従来法では陰性であったが、本発明の測定方法では陽性であった（表1）。しかし、従来法で1998年の測定結果が陰性と認められたものであっても1999～2001年の測定結果については、陽性が認められた。

一方、検体No. 10～17については従来法と本発明の測定結果ともに陽性であり、一致した（表2）。また、検体No. 18～28については従来法と本発明の測定結果ともに陰性であり、一致した（表3）。

不一致の検体については、従来法で陰性であったにもかかわらず、本発明の抗原ペプチドを用いて測定を行った系では陽性と判断され、感度よくB DV抗体の

検出が可能となった。なお、表1～3中の「ND」は、ウマを捕獲することができず、測定できなかったことを示す。

【0034】

【表1】

| 検体番号 | 本発明の方法(単位:C. O. I.) | | | | | 従来法 陽性:1000以上 | | | |
|------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|-------------|-------------|--------------|
| | 1998年 | | | | | 1998年 | 1999年 | 2000年 | 2001年 |
| | p24(A) | p40(C) | p40(D) | p10(G) | p10(H) | | | | |
| 1 | 2.5 (+) | 1.58 (+) | 0.00 | 0.76 | 4.38 (+) | 228 | 349 | 1162 (+) | 1334 (+) |
| 2 | 1.3 (+) | 1.02 (+) | 0.26 | 1.4 (+) | 4.14 (+) | 588 | 763 | 2098 (+) | ND |
| 3 | 24.62 (+) | 12.66 (+) | 1.62 (+) | 10.1 (+) | 6.78 (+) | 634 | 511 | 1353 (+) | ND |
| 4 | 60.44 (+) | 29.7 (+) | 1.74 (+) | 9.81 (+) | 4.78 (+) | 361 | 1574 (+) | 594 | 877 |
| 5 | 5.12 (+) | 4.7 (+) | 2.36 (+) | 7.12 (+) | 6.18 (+) | 397 | 1115 (+) | 1716 (+) | 771 |
| 6 | 2.88 (+) | 1.14 (+) | 0.02 | 1.140 (+) | 0.36 | 276 | 938 | 1580 (+) | 1809 (+) |
| 7 | 1.46 (+) | 3.24 (+) | 0.64 | 1.02 (+) | 0.60 | 276 | 284 | 4834 (+) | 9288 (+) |
| 8 | 11.56 (+) | 6.48 (+) | 0.56 | 5.33 (+) | 2.84 (+) | 116 | 979 | 1630 (+) | 791 |
| 9 | 89.46 (+) | 54.76 (+) | 13.84 (+) | 76.42 (+) | 54.64 (+) | 31 | ND | ND | 22504 (+) |

【0035】

【表2】

| 検体番号 | 本発明の方法(単位:C. O. I.) | | | | | 従来法 陽性:1000以上 | | | |
|------|---------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1998年 | | | | | 1998年 | 1999年 | 2000年 | 2001年 |
| | p24(A) | p40(C) | p40(D) | p10(G) | p10(H) | | | | |
| 10 | 0.64 (+) | 3.4 (+) | 3.44 (+) | 9.11 (+) | 73.92 (+) | 9124 (+) | 9169 (+) | 19569 (+) | 13441 (+) |
| 11 | 14.66 (+) | 14.38 (+) | 8.92 (+) | 13.30 (+) | 12.06 (+) | 19648 (+) | 10323 (+) | 12544 (+) | 13351 (+) |
| 12 | 4.02 (+) | 1.64 (+) | 2.44 (+) | 4.89 (+) | 4.08 (+) | 14710 (+) | ND | 7462 (+) | ND |
| 13 | 1.46 (+) | 2.8 (+) | 1.66 (+) | 0.46 | 0.00 | 9614 (+) | 10317 (+) | 14289 (+) | 12097 (+) |
| 14 | 12.14 (+) | 2.56 (+) | 0.28 | 1.30 (+) | 3.64 (+) | 5960 (+) | 3136 (+) | 8933 (+) | ND |
| 15 | 1.86 (+) | 1.62 (+) | 0.40 | 1.64 (+) | 7.02 (+) | 2689 (+) | ND | 3625 (+) | 1954 (+) |
| 16 | 1.1 (+) | 1.38 (+) | 0.58 | 1.50 (+) | 1.58 (+) | 1365 (+) | ND | 788 | 2051 |
| 17 | 9.36 (+) | 6.7 (+) | 0.00 | 2.16 (+) | 0.10 | 1935 (+) | 1269 (+) | ND | ND |

【0036】

【表3】

| 検体番号 | 本発明の方法(単位:C. O. I.) | | | | | 従来法 陽性:1000以上 | | | |
|------|---------------------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| | 1998年 | | | | | 1998年 | 1999年 | 2000年 | 2001年 |
| | p24(A) | p40(C) | p40(D) | p10(G) | p10(H) | | | | |
| 18 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 407 | 851 | 869 | 944 |
| 19 | 0.56 | 0.22 | 0.16 | 0.00 | 0.00 | 103 | 308 | 310 | 245 |
| 20 | 0.58 | 0.34 | 0.20 | 0.64 | 0.14 | 165 | 820 | 3646 (+) | 3206 (+) |
| 21 | 0.12 | 0.24 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 449 | 292 | 644 | 823 |
| 22 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 373 | 876 | 1398 (+) | 2530 (+) |
| 23 | 0.04 | 0.06 | 0.00 | 0.12 | 0.00 | 76 | 16429 (+) | 391 | 390 |
| 24 | 0.00 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 443 | 566 | 1606 (+) | 982 |
| 25 | 0.02 | 0.00 | 0.52 | 0.00 | 0.00 | 138 | 648 | 348 | 305 |
| 26 | 0.00 | 0.72 | 0.32 | 0.00 | 0.00 | 276 | 378 | 955 | 1851 (+) |
| 27 | 0.62 | 0.80 | 0.08 | 0.28 | 0.00 | 263 | 805 | 751 | ND |
| 28 | 0.54 | 0.00 | 0.00 | 0.12 | 0.00 | 352 | ND | ND | ND |

【0037】

(実施例2)

宮崎県都井岬で管理されている82頭のウマについて、1998年に採取した血清を、本発明の抗原ポリペプチドを用いて実施例1に記載の方法で測定した結果及び従来法である比較例の方法で測定した結果、各測定法によりBDV抗体陽性及び陰性と判断された群について5年間の生存率を調べた。その結果、表4に示すように、本発明の方法で測定した場合には抗体陽性の場合の死亡率が66.7%であり、抗体陰性の場合には死亡率が28.3%であった。一方、従来法による場合には抗体が陽性の場合の死亡率は52.4%であったが、抗体が陰性の場合でも死亡率は42.6%であった。本発明の抗原ポリペプチドを用いて測定した場合は抗体陽性の死亡率が高くあらわれ、測定結果が死亡率に反映し、より正確なBDV感染の検査を行うことが可能となった。

【0038】

【表4】

| | | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 |
|------------|----|------|------|------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 凝集法(本発明方法) | 陽性 | 36 | | | 12(33.3%) 7(19.4%) 17(47.2%) | 生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=24(66.7%) |
| 凝集法(本発明方法) | 陰性 | 46 | | | 33(71.7%) 4(8.7%) 9(19.6%) | 生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=13(28.3%) |
| 従来法 | 陽性 | 21 | | | 10(47.6%) 5(23.8%) 6(28.6%) | 生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=11(52.4%) |
| | | | | | 35(57.4%) 6(9.8%) 20(32.8%) | 生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=26(42.6%) |

【0039】

【発明の効果】

以上説明したように本発明の抗原ポリペプチドを用いて測定した結果、B D V に関する抗原そのものを検出することができないような場合であっても、抗体の出現を見逃すことなく検出することが可能となる。さらに、例示するC I A法は、人畜共通感染症の起因となるB D V を、ウマやヒト等について同一の試薬を用いて検出することができ、極めて有用である。

【0040】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sysmex Corporation

<120> BDV antigen peptide

<130> NP02-1126

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Bornavirus

<400> 1

Gln Pro Val Asp Gln Leu Leu Lys Asp Leu Arg Lys Asn Pro Ser

1

5

10

15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Bornavirus

•
<400> 2

Asp Pro Asp Gln Arg Thr Gly Arg Glu Gln Leu Ser Asn Asp Glu Leu
1 5 10 15

Ile

•
<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Bornavirus

<400> 3

Pro Lys Arg Arg Leu Val Asp Asp Ala Asp Ala Met Glu Asp Gln Asp
1 5 10 15

Leu Tyr

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Bornavirus

<400> 4

Arg Tyr Arg Arg Glu Ile Ser Arg Gly Glu Asp Gly Ala Glu Leu
1 5 10 15

Ser Gly Glu

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Bornavirus

<400> 5

Gly Asn Thr Thr Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Gly Gly Arg Arg Arg
1 5 10 15

Ser Pro Asp

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 6

Gly Leu Thr Lys Thr Lys Glu Asp Ser Lys Glu Cys Thr Asp Pro
1 5 10 15

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 7

Gly Asn Ala Thr Ile Glu Ser Gly Arg Leu Pro Gly Gly Arg Arg Arg
1 5 10 15

Ser Pro Asp

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 8

Gly Val Thr Lys Thr Thr Glu Asp Pro Lys Glu Cys Thr Asp Pro

1

5

10

15

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ボルナ病ウイルス(Borna Disease Virus, 以下「BDV」という。)に対する抗体検査をより正確に実施するための抗原ポリペプチド及び該ポリペプチドを用いたBDV測定方法を提供する。

【解決手段】 BDVを構成する蛋白質のうち、p10領域から選択された抗原を、p24領域及び／又はp40領域から選択される抗原ポリペプチドを組み合わせて使用することによる。具体的には、配列番号7および8に記載の抗原ポリペプチドをp24領域及び／又はp40領域から選択される抗原ポリペプチドと組み合わせて使用することによる。

認定・付加情報

特許出願の番号 特願2003-078898
受付番号 50300464141
書類名 特許願
担当官 第一担当上席 0090
作成日 平成15年 3月24日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 3月20日

次頁無

特願 2003-078898

出願人履歴情報

識別番号 [390014960]

1. 変更年月日 1998年10月 7日

[変更理由] 名称変更

住所変更

住 所 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
氏 名 シスメックス株式会社